

⑫ 公開特許公報(A) 平3-277291

⑬ Int. Cl.³

C 12 N 15/85

識別記号

ZNA:

庁内整理番号

8717-4B

C 12 N 15/00

⑭ 公開 平成3年(1991)12月9日

A

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全6頁)

⑮ 発明の名称 光合成関連遺伝子及びそのプロモーター

⑯ 特 願 平2-75774

⑰ 出 願 平2(1990)3月27日

⑱ 発 明 者	坂 本	正 弘	千葉県茂原市町保138-1
⑱ 発 明 者	藤 村	達 人	神奈川県相模原市下溝956-2
⑱ 発 明 者	松 岡	信	茨城県つくば市松代5-242-1-521-404
⑱ 発 明 者	鮫 島	宗 明	茨城県つくば市松代5-242-1-545-2
⑲ 出 願 人	三井東圧化学株式会社		東京都千代田区霞が関3丁目2番5号
⑲ 出 願 人	農林水産省農業生物資源研究所長		茨城県つくば市観音台2丁目1-2
⑳ 代 理 人	弁理士 谷川 英次郎		

明 示 書

1. 発明の名称

光合成関連遺伝子及びそのプロモーター

2. 特許請求の範囲

- (1) 葉光性クロロフィル a/b 結合タンパク質遺伝子のプロモーターを含む DNA 断片。
- (2) イネ由来のものである請求項 1 記載の DNA 断片。
- (3) 図 1 に示す塩基配列の第 785 番目から +59 番目の塩基配列を有する請求項 2 記載の DNA 断片。
- (4) 請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の DNA 断片を含む植物細胞用ベクター。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、植物の光合成に関する葉光性クロロフィル a/b 結合タンパク質の遺伝子及びそのプロモーターに関するものであり、遺伝子組換えを利用した植物の新品種の開発や代謝産物を生産

させる培養細胞の改変に利用される。

〔従来の技術〕

近年、植物でも遺伝子組み換え技術の利用が可能になり、特に双子葉植物での研究が活発に行なわれている。中でも土壌細菌アグロバクテリウム・トウメファシエンスの Ti プラスミドを利用したベクター系がいくつか作製され、植物の形質転換実験に用いられてきた (Hoekema ら (1985) Plant Molecular Biology 5:85-89, Velten ら (1984) The EMBO Journal 3:2723-2730 他)。しかしながら、アグロバクテリウム属は双子葉植物と単子葉植物の狭く限られた一部にしか感染しないため、イネを始めとする主要穀物では殆ど形質転換実験は不可能であった。この問題を解決した技術がエレクトロポレーション法である (Froma ら (1986) Nature 319:791-793 他)。この方法は単純したプロトプラストに電気的刺激を与えることにより、細胞表面に極く小さな穴を開け、そこから遺伝子を取り込ませて形質転換を行う技術である。この方法が開発されたことにより、イネを

始めとする主要穀物においても形質転換実験が可能となり、現在盛んに行なわれている。

従来用いられてきたベクター系におけるプロモーターはアグロバクテリウム・トウモロコシエンシスのTiプラスミドの遺伝子由来のプロモーターであるか、あるいはカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の遺伝子由来のプロモーターが殆どである。これらのプロモーターは、遺伝子を植物内で効率よく発現させるためのプロモーターとして使用されてきた。しかしながら、これらのプロモーターは遺伝子導入後の植物の生育時期や植物部位に関係なく常に遺伝子を発現させるものであり、制御することが不可能なプロモーターであった。

〔発明が解決しようとする課題〕

現在、植物細胞に効率よく遺伝子を導入する技術は完成されており、遺伝子を発現させるための強力なプロモーターが使用されている。しかしながら、実際の植物育種にあたっては常に遺伝子を発現させているプロモーターでは不都合な面も

ある。そこで、生育時期特異的にあるいは器官特異的に発現させることのできるプロモーターや人為的に制御が可能なプロモーターが望まれる。

〔課題を解決するための手段〕

植物の葉緑体のチラコイド膜に存在している集光性クロロフェイル *a/b* 結合タンパク質 (以下、LHCP II と略することがある) は光合成系 II の集光性クロロフィルを結合した複合タンパク質であり、光合成において重要な役割を果たしている。その遺伝子は核 DNA にコードされており、光によって誘導がかかり葉緑体中で発現することが知られている。

本発明者らは、この LHCP II 遺伝子のプロモーターを利用することにより、光によって遺伝子発現の誘導を行なえるのではないかと考え LHCP II の遺伝子をクローニングし、プロモーター部分の解析を行なった。そしてこのプロモーター部分を切り出し大腸菌由来の β -グルクロニダーゼ遺伝子に接合し、このキメラ遺伝

子を植物細胞に導入した。遺伝子導入を行なった細胞を培養したカルス (細胞塊) やそれより再分化した植物体では光を照射することによって β -グルクロニダーゼ遺伝子が発現することが確認できた。従って、LHCP II 遺伝子のプロモーターは光によって誘導がかけられることを確認し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質遺伝子のプロモーターを含む DNA 断片を提供する。

さらにまた、本発明は、上記本発明の DNA 断片を含む植物細胞用ベクターを提供する。

〔発明の効果〕

本発明により、光照射によって発現を制御できるプロモーターを含む新規な DNA 断片及びこれを含む新規な植物細胞用ベクターが提供された。本発明により開発されたベクターを用いることにより導入遺伝子を光を照射することにより発現させることが可能となった。また、最も発現量が認められることから、遺伝子を発現させる

部位に特異性を持たせられる可能性も示唆された。従って、本発明は、植物の遺伝子工学に大いに貢献するものと考えられる。

〔発明の具体的説明〕

上述のように、本発明の DNA 断片は、LHCP II 遺伝子のプロモーターを含む。該プロモーターの由来は特に限定されないが、下記実施例においてはプロモーター部分を含む、イネの LHCP II 遺伝子が単離されている。下記実施例において単離された LHCP II 遺伝子の全構造及びプロモーター領域の DNA 塩基配列が図 1 に示されている。特で囲んだ部分が LHCP II 遺伝子の構造部分を示す。+1 は LHCP II 遺伝子の転写開始点を、また +60 の ATG は成熟 LHCP II のタンパク質の第 1 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を表わす。遺伝子の転写に必要な要素である CAT ボックスと TATA ボックスはそれぞれ -91 と -29 に認められる。また、-64 には最近 Grobらによって報告された光感受性ボックスが存在する (Grobら [1988] Nucleic Acids

Research 23: 9953-9973)。下記実施例においては、図1に示される塩基配列の第-785番目から+59番目の塩基配列を有するDNA断片をベクターに組み込んで該DNA断片の下流に存在する外来遺伝子の発現に成功しているので、プロモーター配列は少なくともこのDNA断片中に完全に含まれていることは明らかである。

一般に、特定の機能を有するDNA配列において、少数のヌクレオチドが置換し、欠失し又は付加された場合であっても実質的に同一の機能を発揮し得る場合があることは当業者に広く認識されているところである。従って、図1に示されるDNA断片中に含まれるプロモーターのDNA配列のうち、少数のヌクレオチドが置換し、欠失し又は付加された配列を有するDNA断片であっても、その配列がプロモーターとして機能するのであれば、その配列は本願特許請求の範囲にいう「プロモーター」に含まれるものとし、このような配列を含むDNA断片は本発明の範囲に含まれるものと解釈するものとする。

挿入されたベクターpLB/GUSが得られている。

次に、上記本発明のDNA断片及びベクターの調製方法をイネを例にとって説明する。なお、本発明のDNA断片の調製方法は下記のものに限定されるものではない。

まず、イネのcDNAライブラリーを作製する。イネの場合、例えば発芽後約2週間経過した芽生えより全RNAを抽出することが好ましい。全RNAよりmRNAのみを単離し、市販のキット等を用いた常法によりcDNAを合成する。合成したcDNAを例えば大腸菌用のクローニングベクターに接続しcDNAライブラリーを完成させる。

LHCPⅡ遺伝子に特異的な配列をプローブとして合成し、コロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングしLHCPⅡ遺伝子のcDNAを得ることができる。

次に暗所発芽させたイネよりCTAB法(Plant Molecular Biology (1985) 5:59)によってDNAを抽出し、大腸菌のクローニング用のベ

本発明はさらに、上記本発明のDNA断片を含む植物細胞用ベクターを提供する。本発明のベクターは、宿主細胞内で自律的に複製するための複製開始点と、好ましくは例えば薬剤耐性のような適当な選択マーカーを有するプラスミドに上記本発明のDNA断片を組み込むことによって得ることができる。このようなプラスミドとしては、植物細胞用のベクターとして公知のもの、例えばpBI101(クローンテック社製)を用いることができ、このような公知のベクターのクローニング部位に本発明のDNA断片を常法により組み込むことによって本発明のベクターを得ることができる。下記実施例においては、図1に示す配列の-785番目から+59番目の塩基配列を有する断片を上記pBI101のXbaI-BamHI消化物中に組み込むことによって本発明のベクターを構築した。本発明のベクターにおいては、上記本発明のDNA断片の下流に所望のタンパク質をコードする構造遺伝子が組み込まれる。下記実施例においては、構造遺伝子としてβ-グルクロニダーゼ遺伝子が

ベクターに接続し、イネのゲノミックライブラリーを作製することができる。

LHCPⅡ遺伝子のcDNAをプローブとしてゲノミックライブラリーをスクリーニングし、イネのLHCPⅡ遺伝子を単離することができる。

プロモーターとしての活性についての検討は次のように実験を行えばよい。例えば、プロモーター活性を持つと考えられる部分をβ-グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子の5'側上流に接続する。β-グルクロニダーゼは本来植物には存在せず、4-メチルウンベリフェロン(4-MU)にグルクロン酸が結合した4-MUGを基質として反応し、その反応生成物4-MUが強い蛍光を発することにより定量できる(Richardら(1989) The EMBO Journal 6: 3901-3907)。LHCPⅡ遺伝子のプロモーターとGUS遺伝子を植物細胞用ベクターに組み込んだ組換えプラスミドを植物のプロトプラストにエレクトロポレーション法により導入する。導入した植物細胞は培養

後、ベクターの選択マーカーに従って選抜する。例えば、本発明のプロモーター含有DNA断片を、GUS遺伝子を有するpBI101に組み込んだ場合には、pBI101のカナマイシン耐性に基づいて選抜することができる。すなわち、pBI101にはNPTⅡ遺伝子も含まれており、この酵素が合成されるとカナマイシンに対して耐性となる。従って、カナマイシン存在下で生き残る細胞はLHCPⅡプロモーターとGUS遺伝子のキメラ遺伝子を持つ可能性が高くなる。

このようにして外来遺伝子を有すると考えられるカルス（細胞塊）より常法に基づき植物体を再分化させる。再分化した植物体を光条件下で遺伝子を発現させ、その植物体を葉、茎、花弁及び根の各器官ごとにGUS活性を測定することにより、いずれの植物体においても葉で最も大きな発現量が確認される。従って、LHCPⅡプロモーターは光存在下において遺伝子を発現させることが可能であり、その発現する場所も葉等の光合成器官の存在する部位に発現しやすいことが確認さ

れる。

従って、本発明によるLHCPⅡ遺伝子のプロモーターを利用することにより、光によって遺伝子が発現誘導できる。また、葉等の光合成器官を有する部位に発現しやすいことから器官特異的に遺伝子を発現させることができる可能性も示唆された。

なお、下記実施例において得られたLHCPⅡプロモーターはイネを始めとする単子葉のみでなく、タバコ等の双子葉植物においても発現可能なプロモーターであった。

【実施例】

本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の実施例はこれらに限られるものではない。なお、下記実施例において特に断わらない限り、各操作は、Maniatisら Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. に記載された方法に基づいて行なった。

先ず、芽生えより以下の方法によりcDNAライブラリーを作製した。すなわち、芽生え後2

週間経過した芽生え30gよりグアニジンチオシアネート法により全RNAを抽出した。抽出した全RNAよりオリゴdTセルロースカラムによりmRNAを単離した。mRNAは全RNAのほぼ1.5%の収量であった。mRNAよりcDNAの合成は市販の合成キット（アマシャム社製）を使用した。合成したcDNAは市販の大腸菌用クローニングベクターであるpUC8のEcoRI部位に接続し、大腸菌を形質転換することによりcDNAライブラリーを得た。

次に、既知のLHCPⅡ遺伝子の構造部分より17塩基の合成プローブ（塩基配列：GCCCATCTGCGAGTGGAT）を作製し、コロニーハイブリダイゼーション法によってポジティブクローンを得た。これを解析したところ既知のLHCPⅡ遺伝子の構造と類似しており、イネのLHCPⅡ遺伝子と断定した。

次に、ゲノミックライブラリーを作製した。すなわち、暗所で発芽させて1週間経過したイネの芽生え30gよりCTAB法（Plant

Molecular Biology (1985) 5:69)によってDNAを抽出した。DNA10μgを制限酵素Sau3AI（宝酒造社製）によって部分分解した。これをベクターEMBL3（ストラタジーン社製）のBamHI部位に接続し、大腸菌に感染させてゲノミックライブラリーを作製した。

cDNAの一部（5'側非翻訳領域から成熟タンパク質のN末端まで含む約260塩基）をプローブとして用いて、ゲノミックライブラリーのスクリーニングを行ない、4つのポジティブクローンを得た。これらの塩基配列をディデオキシ法に従って決定したところ、いずれも同じ配列を有するLHCPⅡ遺伝子であると確認できた。図1に示したものがそのLHCPⅡ遺伝子及びそのプロモーター領域の塩基配列である。

次に、LHCPⅡ遺伝子のプロモーターの活性を検討するためにLHCPⅡ遺伝子のプロモーター部位を切り出し、GUS遺伝子に接続した。すなわち、図1に示す配列の-785目から+59目までの部分をPCR法（Saikiら、

(1988). Science 239: 482-491) によって増幅し、-785 例には制限酵素 XbaI のリンカーを、+59 例には制限酵素 BamHI のリンカーを接続した。次に、pBI101 の XbaI 部位と BamHI 部位をそれぞれ制限酵素で切断し、この部分に LHCP II 遺伝子の上記プロモーター含有断片 (LHCP-pro) を接続した (プラスミド pLH/GUS)。得られたプラスミド pLH/GUS の部分遺伝子地図を図 2 に示す。このプラスミド pLH/GUS を用いて次の形質転換実験を行ない形質転換植物の GUS 活性を検定した。

タバコの葉より常法に基づきプロトプラストを調製した。プロトプラストを精製した後に 2×10^6 個/ml の濃度に懸濁液に懸濁した。この溶液に図 2 に示す構造を持つ pLH/GUS プラスミド DNA を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えた。この懸濁液をエレクトロポレーション用の容器に移し電気刺激を与えた後、プロトプラストを回収し MS 培地で培養した。培養開始後 1 週間してカナマイ

シンを $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で培地に添加し、さらに細胞を増殖させた。カルスが径 $5 \sim 10 \text{mm}$ になった時点で植物ホルモンフリーの培地に移植し再分化させた。このようにして再分化した植物体の葉、莖、花弁、根について Richard らの方法に従って GUS 遺伝子の発現量を測定した。具体的には GUS 遺伝子の産物である酵素が 4MU を分解した産物の 4MU の蛍光を測定することになる。

結果を表 1 に示す。表 1 にも明らかなように、各固体による差があるものの、いずれにおいても葉において GUS 遺伝子の発現量が最も多かった。

表 1

植物固体	GUS 活性 ($4\text{-MU pmol}/\text{min}/\text{mg protein}$)			
	葉	莖	花弁	根
A	344.5	239.7	287.5	75.0
B	108.6	23.5	25.0	96.1
C	519.7	276.7	271.0	149.5
D	431.7	191.1	162.9	122.0
E	353.4	258.9	275.5	99.5

4. 図面の簡単な説明

図 1 は、イネの LHCP II 遺伝子の全構造と 5' 側 (プロモーター部分) の DNA 配列を示す。

図 2 は、図 1 に示した LHCP II 遺伝子のプロモーター部分を切り出し、植物ベクターである pBI101 に含まれる β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子の上流に接続することにより構築したプラスミド pLH/GUS の遺伝子地図を示す。

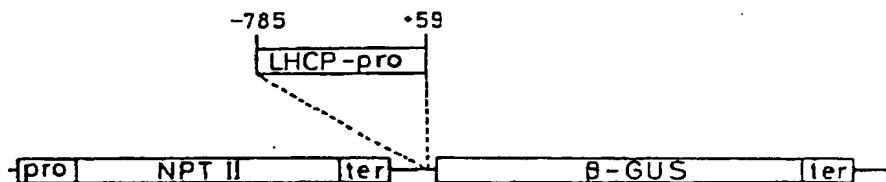
特許出願人 農林水産省生物資源研究所長

同 三井東圧株式会社

特許出願人代理人 弁理士 谷川 英次郎

谷川英次郎
印

41



PLH/GUS

图 2

NCBI Entrez Nucleotide QUERY BLAST Entrez ?

Other Formats:

Links:

LOCUS AB008794 2817 bp DNA PLN 02-SEP-1998
 DEFINITION Oryza sativa Japonica Wxb gene, promoter region and partial cds.
 ACCESSION AB008794
 NID g3434976
 VERSION AB008794.1 GI:3434976
 KEYWORDS Wx.
 SOURCE Oryza sativa (sub_species:Japonica, cultivar:Taichung65) DNA.
 ORGANISM Oryza sativa
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales;
 Poaceae; Oryza.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2817)
 AUTHORS Hirano, H.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (10-NOV-1997) to the DDBJ/EMBL/GenBank databases.
 Hiroyuki Hirano, The University of Tokyo, Graduate School of
 Agricultural and Life Sciences; Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan
 (E-mail:ahirano@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp,
 Tel:81-3-3812-2111 (ex. 5065))
 REFERENCE 2 (sites)
 AUTHORS Hirano, H. Y., Eiguchi, M. and Sano, Y.
 TITLE A single base change altered the regulation of the Waxy gene at the
 posttranscriptional level during the domestication of rice
 JOURNAL Mol. Biol. Evol. 15 (8), 978-987 (1998)
 MEDLINE 98384837
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..2817
 /organism="Oryza sativa"
 /cultivar="Taichung65"
 /sub_species="Japonica"
 /db_xref="taxon:4530"
 gene 1483..2817
 /gene="Wx"
 exon 1483..1619
 /gene="Wx"
 /note="Wxb allele"
 /number=1
 intron 1620..2742
 /gene="Wx"
 /cons_splice=(5' site:NO, 3' site:YES)
 /number=1
 exon 2743..>2817
 /gene="Wx"
 /note="Wxb allele"
 /number=2
 CDS 2780..>2817
 /gene="Wx"
 /standard_name="Waxy"
 /note="Wxb allele"
 /codon_start=1
 /protein_id="BAA32471.1"
 /db_xref="PID:d1033434"
 /db_xref="PID:8450761"
 /db_xref="GI:3450761"
 /translation="MSALTTSQLATSA"
 BASE COUNT 791 a 674 c 586 g 766 t
 ORIGIN
 1 gccgaggggac ctaatctgca cgggttttaa tagttgaggg acccgttgta tctggttttg
 61 cggttggaagg acggaattg gatttattga caagtcaagg gaccttagat gaacttattc
 121 ctttttatat ttgcacaggc ctaatttcaa gtccagccca gctttotica gcctgtttga
 181 taattctctc tagcttatta cagccgtggg agaggagata tacagctaca agattacaag
 241 tcgatgtata cagcaaaccc atgagctgat tgcctgatta gacggtaaga atgcatccct
 301 gagaagcaaa tgcataccca aattttagtc ttagataaat gctgtgacct gcaagaaaat
 361 aaaattaaaa tcaaaaataaa agaaaagcgc aggttaattga caccacacgc atataagtgt
 421 agatacataa cagttcatc taatcatctt aattagactt aggtaaaact acaatgaggt
 481 ttatgtccta cggaatgacg acaagctagc agcacagagg cacagatcat atcgtctcca
 541 gactcaagtg cagttgatc gttcgtcac tgcttcatcg atcatccctt tgtcagggcg

601 ttagttggca ggcactaata gctacagtaa agtaaagagc aacgtgccaa cgtacgcacg
661 ctaacgtgag tcatgtagcg taattccaag ttcttttttt ttgtcagca cgtacaagca
721 gccgctagcc tcgccctgca tgagaagctc gcggcgcgcc accaaactgg caggcactca
781 gctcgtgct ggtcccgac gtcgccacac gatcgacgta cgcacgcgag cgagatccac
841 cgtggttta cgcgtacgcc gacggctcac acatcccccg gtgcccaaca gaaaccacac
901 accacccgca cgaaaaaaac cgaaccgcac gtgcgcgcgc gctccacgca caccocaaac
961 agacggcagc gcgggagcgc gcgcgcgcac gcgagccgag gagaaaaaa acgggggaaa
1021 caagctggaa aagcaaaaagg ggaaaagaac ggagcggagg cttaccaccac ggccaccgcg
1081 acgcgccacc agcgtgcggt gcaatgcaac gtacgccaag ccgaaacggc aggcagcatc
1141 gcgcacgcac gcacacacag gccacagcac acgcgagcga cgtacgcgag tgcattgcaga
1201 tgcattgcgc gggctcgcgc gagaccggcc gatgggttcg cttctcttct cttcccgctc
1261 ccgttcgctc gtcattagaca aaagtcggtt ttgcttttgg ttttttggct ctgaggcact
1321 gacgtgcggg ccagcgtacg cctgcgtgcc ccgcatgtca tcgtcgacac cggccgggga
1381 ccgggtaaaa tgtgttgccg gagggagagg gggagagaga gatcgcgcg gcttcacgca
1441 acggcgctac aaatagccac ccacaccacc accccctctc tcaccattcc ttcagttctt
1501 tctctatctc aagacacaaa taactgcagt ctctctctct ctctctctct ctctctctct
1561 ctctgcttca cttctctgct tgtgtgttc tgtgtttcat caggagaac atctgcaagt
1621 tatacatata tgtttataat tctttgttc cctcttatt cagatcgatc acatgcatct
1681 ttcattgctc gtttttctt acaagtagtc tcatacatgc taatttctgt aagggtgttg
1741 gctggaaatt aattaattaa ttaattgact tgccaagatc catatatatg tctgatatt
1801 aaatcttctg tcgttatggt tggttaggct gatcaatggt attctagagt ctagagaaac
1861 acaccacagg gttttccaac tagctccaca agatgtgtgg ctagctgacc tagatttgaa
1921 gtctcactcc ttataattat ttatatttag atcattttct aatattcgtg tcttttttta
1981 ttctagagtc tagatcttgt gttcaactct cgttaaatca tgtctctcgc cactggagaa
2041 acagatcagg agggtttatt ttgggtatag gtcaaaagcta agattgaaat tcacaaatag
2101 taaaatcaga atccaaccaa ttttagtagc cgagttggtc aaaggaaaat gtatatagct
2161 agatttattg ttttgcaaaa aaaaaatctg aatatgcaaa atacttgtat atctttgtat
2221 taagaagatg aaaaataagta gcagaaaatt aaaaaatgga ttatatattcc tgggctaaaa
2281 gaattgttga tttggcaca ttaaatlcag tgtcaagggt ttgtgcaaga attcagtggtg
2341 aaggaataga ttctcttcaa aacaatttaa tcattcatct gatctgctca aagctctgtg
2401 catctccggg tgcaacggcc aggataatta ttgtgcagta aaaaaatgtc atatccctta
2461 gccacccaag aaactgctcc ttaagtcctt ataagcacat atggcattgt aatatatatg
2521 tttgagtttt agcgacaatt tttttaaaaa cttttggtcc tttttatgaa cgttttaagt
2581 ttcaactgtct ttttttttcg aatttttaaa gtagcttcaa attctaattcc ccaatccaaa
2641 ttgtaataaa cttcaattct cctaattaac atcttaattc atttatttga aaaccagttc
2701 aaattctttt aggtcacca aaccttaaac aattcaattc agtgcagaga tcttcacag
2761 caacagctag acaaccacca tgtcggctct caccacgtcc cagctcgcca cctcggc

//

Save the above report in format
